

# 疎水性色素 (Oil red O) の血清に対する 溶解度及び溶解状態

竹中 邦子\* 中森 裕子\*\*

## Solubility of a Hydrophobic Dye (Oil red O) in Serum

Kuniko Takenaka and Hiroko Nakamori

### I 緒 言

医薬品や食品添加物の中には、多くの疎水性物質が含まれている。これらの物質が体内に取り込まれた場合、主に腸管より吸収され循環器系に入るが、血清中では単独に存在せず、いくつかの受容体と結合して、代謝・排泄・蓄積の機構が形成されると考えられる。従って、これらの疎水性物質の代謝・排泄速度は、受容体との結合の強さや受容体分子への取り込みの深さによって影響されるであろう。

サルファ剤に対しては、主として血清アルブミンが受容体として作用すると考えられているが<sup>1),2)</sup>、最近、近藤ら<sup>3)</sup>は血清中にはアルブミン以外にも受容体が存在することを明らかにし、それがリポ蛋白であることを示唆している。血液中での疎水性物質と受容体(球状蛋白、リポ蛋白など)との相互反応は、主として疎水性自由エネルギーに基づくと考えられ<sup>4)~6)</sup>、溶媒(水)の構造変化に由来するエントロピー支配の過程であると予想される。一方、疎水性分子の受容体分子への取り込みの深さ及び量は、受容体分子内部の構造エントロピーによって決まると考えられる。即ち、疎水領域に疎水性分子が取り込まれる結果、リガンド量の増大に伴い、脂肪鎖の伸長による構造エントロピーの減少が起こり、分子の合一・壊裂などの物性変化が生じると予想される。

本研究では、疎水性低分子物質として、脂質染色剤として知られている Oil red O を、ブタ血清に溶解させ、血清中における受容体を同定し、更にそれらの分子の溶解状態及び取り込みによって生じる物性変化

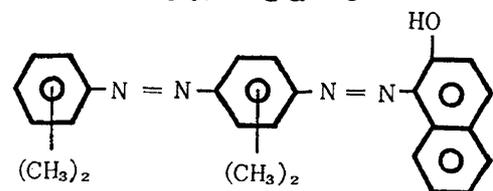
を調べることが目的である。

### II 実験方法

#### 1. 試料及び試料の調製

リガンドとしての Oil red O (Azoxylene-4-azo-2-naphthol) は、CHROMA 社製を用いた。構造式は次のとおりである<sup>9)</sup>。

Ligand : Oil Red O



Acceptor : serum protein  
and lipoprotein

(分子量 : 408)

血液は、ブタ血液を冷却機付万能遠心機(富永製作所, No. 4 ローター使用)にて、5℃, 8200×g, 15分間遠心分離し、得られた上澄血清を使用した。血清は、0.02%の窒化ナトリウム及び EDTA-2Na を含むように調整し、保存は冷蔵庫中で行った。

血清リポ蛋白の分離は<sup>10)</sup>、血清を NaBr で  $\rho=1.1$  9g/ml に調整後、日立 65P 分離用超遠心機 (RP-65TA ローター使用) で 5℃, 126800×g, 30時間遠心した。採取したリポ蛋白は、5℃の冷蔵庫中にて、TRIS-Glycine Buffer (pH8.3) に透析を行った。この場合も内外液共に、0.02%の窒化ナトリウム及び EDTA-2Na を含む。透析チューブは Visking Cell-

\* 生物化学研究室大学院生

\*\* 生物化学研究室

ulose Tube (直径0.6 cm, 1/2巾1.0 cm) を用いた。

血清中の各リポ蛋白 (極低密度リポ蛋白: VLDL, 密度リポ蛋白: LDL, 高密度リポ蛋白: HDL) の分離は, 密度差超遠心法によって行った<sup>10)</sup>。まず, 血清をそのまま ( $\rho=1.007\text{ g/ml}$ ) 分離用超遠心機にて  $5^\circ\text{C}$ ,  $126800\times\text{g}$  で18時間遠心して浮上した VLDL を除く。残った液を NaCl にて  $\rho=1.063\text{ g/ml}$  に調整し,  $5^\circ\text{C}$ ,  $126800\times\text{g}$  で36時間遠心して LDL を得る。更に, LDL を取り去った液を  $\rho=1.19\text{ g/ml}$  に NaBr で調整し,  $5^\circ\text{C}$ ,  $126800\times\text{g}$ , 48時間遠心して浮上してくるものを HDL のサンプルとした。このようにして得られた LDL, HDL は, 全リポ蛋白と同様, 冷蔵庫中にて Buffer (pH8.3) に透析する。全リポ蛋白及び LDL, HDL の濃度の測定は, 乾燥重量法, Lowry 法, 紫外吸収法によった。

## 2. 操作

### 1) 疎水性色素の溶解度測定

一定量の血清及びリポ蛋白溶液に, Oil red O を過剰に加え, ゆるやかに攪拌しながらインキュベーター中 ( $20^\circ\text{C}$ ) に放置し, 日を追って, その一部約  $1\text{ ml}$  を取る。過剰の色素を東洋濾紙 No. 2 で濾過した後, マイクロピペットで  $200\ \mu\text{l}$  取り,  $2\text{ ml}$  のメタノール溶液中に加える。1時間放置後,  $4\text{ ml}$  のクロロホルムを加え, 更に1時間放置する。この操作は,  $10\text{ ml}$  容量の三角コルベンで行い, 蒸発を除く為にシリコン栓を用いて, 室温で行った。色素抽出後, 凝固した蛋白を除く為に東洋濾紙 No. 2 で濾過し, 濾液を  $525\text{ nm}$  で比色し, 予め作成した検量線より溶解している Oil red O の量を求めた。BSA 溶液については, 人の正常血清蛋白質中のアルブミン含量より算出して<sup>11)</sup>,  $4\%$  BSA/ $0.1\text{ M NaCl}$  (含,  $0.02\%$  窒化ナトリウム, EDTA-2Na) について行った。

### 2) ゲル濾過による受容体の確認

Sepharose 4B を用いて, 色素分子を受け取った受容体を分画し, 溶出容積及びおよその分子量より受容体を推定した。

カラムは内径  $1.6\text{ cm}$ , 高さ  $21\text{ cm}$  で, 流速は  $7.5\text{ ml/cm}^2\cdot\text{hr}$ . に保ち, フラクションコレクターで  $2\text{ ml}$  ずつ集めた。Buffer は TRIS-Glycine Buffer (pH8.3, 以下 Buffer とはこの液をさす) を用い, サンプルは Oil red O でインキュベートした血清及びリポ蛋白溶液で, 前者はそのまま, 後者は適量を Buffer で希釈して  $1\text{ ml}$  流した。溶出パターンの測定は,  $520\text{ nm}$  及び  $280\text{ nm}$  における吸光度の測定によって行った。又, Void Volume の測定は,  $0.1\%$

Blue Dextran を用いて行い,  $625\text{ nm}$  の吸光度より求めた。

### 3) 超遠心法による受容体の同定

全てのリポ蛋白が浮上し, 蛋白質は全て沈降するような溶媒密度で色素-受容体の混合物を超遠心することによって, 色素のリポ蛋白及び蛋白質に対する結合の割合を知ることができる。

過剰の Oil red O とインキュベートした血清の1日目と10日目のサンプルについて, 過剰の色素を東洋濾紙 No. 2 で除いた後, 溶液の密度を  $\rho=1.19\text{ g/ml}$  に NaBr で調整し, 超遠心を行った。色素の分布を調べる為, 遠心チューブの上部より  $1\text{ ml}$  ずつ採取し Oil red O の濃度分布を測定した。濃度の測定は, 前記の方法と同様である。尚, 超遠心機の分析条件は, 試料リポ蛋白分離の場合に準じた。

### 4) 沈降速度定数の測定

色素をリポ蛋白に溶解させることにより, 後者の溶液物性に変化がみられるかどうかを知る為に, 沈降速度の変化を調べた。沈降及び浮上界面のシュリーレン像が非対称の場合でも, ピークの最高位置の移動速度から速度定数を計算し, その重量平均速度定数とした。サンプル濃度は,  $1.5\%$  になるように Buffer で希釈し, 色素とインキュベートして1日目のサンプルについては浮上速度定数 (Sf) 及び沈降速度定数 (S) を測定し, 7日目については S のみを測定した。溶媒密度は沈降の場合  $\rho=1.007\text{ g/ml}$ , 浮上の場合  $\rho=1.19\text{ g/ml}$  に NaBr で調整し, 比較の為に未処理のものについても同時に測定を行った。使用した超遠心機は Beckman Spinco model E で,  $20^\circ\text{C}$ ,  $50740\text{ r.p.m.}$  で  $12\text{ mm}$  のシングル又はダブルセクターセルを用いた。

### 5) 受容体に取り込まれた Oil red O の交換速度

一旦, LDL あるいは HDL に取り込まれた色素が, 受容体間に分配交換されるかどうかを調べることは, 極めて興味深いことである。分配交換が自由に起こるとした場合, どの程度の速度でそれが起こるかを調べる為に, LDL から HDL へ, また逆に HDL から LDL への色素の移行速度をゲル濾過及びゲル電気泳動で試みた。まず, 色素で飽和した LDL あるいは HDL を未処理の HDL, LDL と同量の割合で混和し, インキュベーター中 ( $20^\circ\text{C}$ ) にて一定時間放置する。適当な時間間隔をおいてサンプルを取り, ゲル濾過と電気泳動で HDL 及び LDL に取り込まれた色素の相対量を測定した。ゲル濾過には, Sepharose 2B, 4B, 並びに Sephadex G-200 のカラム ( $1.6\times 23\text{ cm}$ )

を用い、Buffer (pH 8.3) 中で流速  $7.5 \text{ ml/cm}^2 \cdot \text{hr}$  で行い、溶出パターンは  $520 \text{ nm}$  及び  $280 \text{ nm}$  の吸光度より得た。電気泳動のゲル濃度は、アクリルアミド  $3.75\%$ 、ビス  $0.1\%$  とし<sup>12)</sup>、通電は疎孔ゲル中では1本のカラムにつき  $1 \text{ mA}$ 、30分、細孔ゲルでは  $2 \text{ mA}$  とした。電気泳動後、色素のバンドの部分を取り取り、細かくスライスしたものに  $2 \text{ ml}$  の氷酢酸を加え、24時間、 $20^\circ \text{C}$  のインキュベーター中に放置し、抽出液を  $523 \text{ nm}$  で比色して、予め作成した検量線より求めた。

### III 実験結果

図1は Oil red O の血清に対する溶解速度の曲線を示したものである。Oil red O の溶解度は、温度と

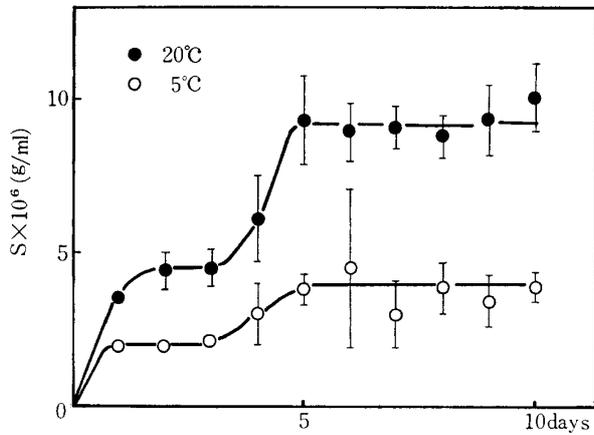


図1 Oil red O の血清に対する溶解  
一定量の血清に Oil red O を過剰に加え、ゆるやかに攪拌しながら  $20^\circ \text{C}$  でインキュベートした後、過剰の色素を除き、溶解した色素を比色定量した。

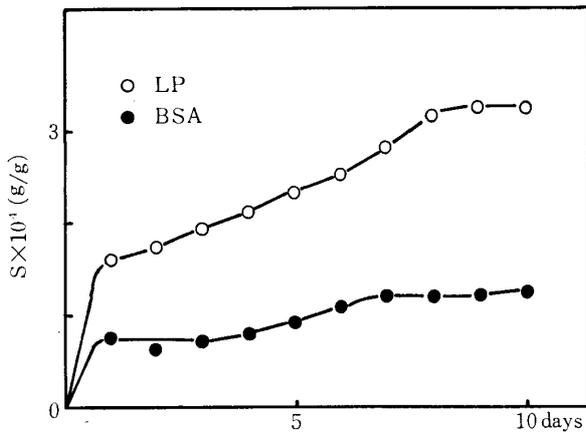


図2 Oil red O のリポ蛋白及び BSA 溶液に対する溶解  
一定量のリポ蛋白溶液 ( $\approx 3.5\%$ )、 $4\%$  BSA/ $0.1 \text{ M NaCl}$  溶液に Oil red O を過剰に加えて  $20^\circ \text{C}$  でインキュベートし、溶解した色素を定量した。

共に増加し、 $5^\circ \text{C}$  及び  $20^\circ \text{C}$  のいずれの場合も2つのプラトーを示している。一方、図2に示すように、血清アルブミンの場合は Oil red O の取り込みが速やかに起こり、比較的短時間で一応の飽和に達する。リポ蛋白の場合は、取り込みの速度は遅いが、 $1 \text{ g}$  あたりの取り込み量は血清アルブミンに比較してかなり多い。

図3には、過剰の Oil red O と共に一定時間インキュベートした血清についてゲル透過を行い、Oil

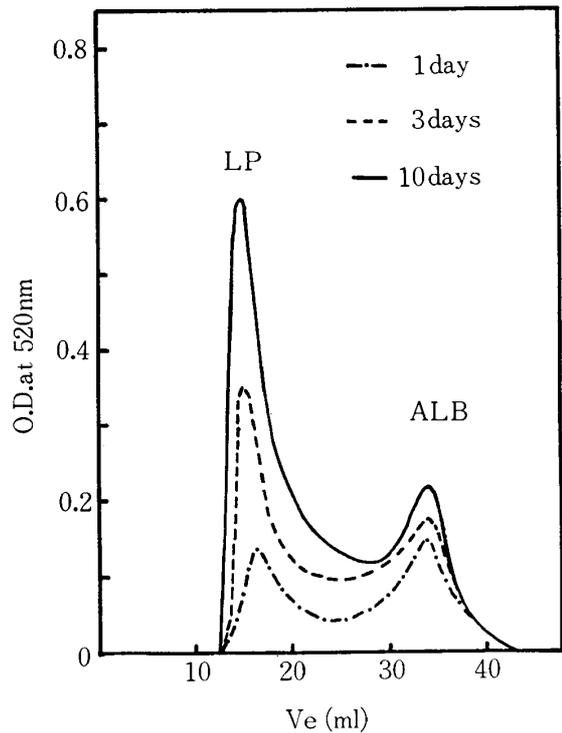


図3 血清に溶解した Oil red O のゲル透過パターン

Oil red O を過剰に血清に加え、 $20^\circ \text{C}$  でインキュベートしたサンプルを  $1 \text{ ml}$  流した。カラムは  $1.6 \times 21 \text{ cm}$ 、流速  $7.5 \text{ ml/cm}^2 \cdot \text{hr}$ 。(LP: リポ蛋白, ALB: 血清アルブミン)

red O の吸収を記録した溶出パターンが示されている。最初のピークは VLDL, LDL, HDL から成るリポ蛋白画分であり、後のピークは主として血清アルブミンを含んでいる。血清リポ蛋白の含量が約  $0.5 \text{ g}/100 \text{ ml}$  であり<sup>10)</sup>、血清アルブミンが約  $5 \text{ g}/100 \text{ ml}$  である<sup>11)</sup>ことを考慮すれば、前者の Oil red O に対する結合容量が極めて大きいことがわかる。

リポ蛋白が Oil red O の主な受容体であることは、Oil red O とインキュベートした血清の超遠心 ( $\rho = 1.19 \text{ g/ml}$ ) の結果からも明らかである。図4に示してあるように、血清に溶解した Oil red O の大部分

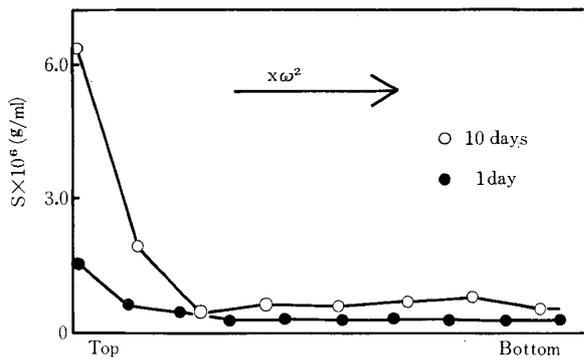


図4 血清に溶解した Oil red O の遠心後の分布  
 過剰の Oil red O とインキュベートした血清  
 の1日目と10日目について、過剰の色素を東洋  
 汙紙 No. 2 で除いた後、溶液の密度を NaBr  
 で  $\rho=1.19\text{g/ml}$  に調整し、 $5^\circ\text{C}$ 、 $126800 \times g$ 、  
 30時間遠心後、上部より 1 ml ずつ採取し、  
 Oil red O の濃度分布を定量した。

が遠心チューブの上部に分布している。Oil red O が  
 チューブの下部ではほぼ一様の分布を示すのは、血清蛋  
 白の分布に対応するからであろう。

Oil red O を取り込むことによって、リポ蛋白に

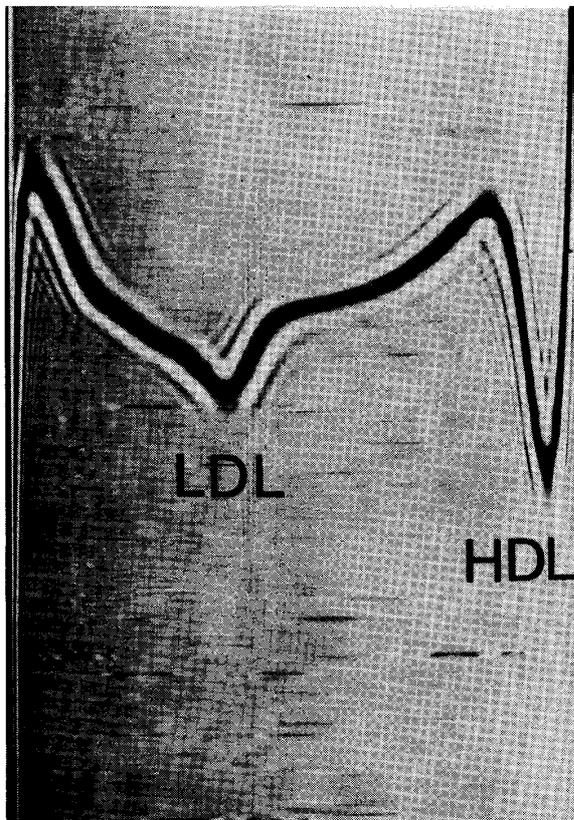


図5 リポ蛋白の浮上パターン  
 リポ蛋白溶液の濃度：1.5%  
 溶媒密度：1.19 g/ml (NaBr)  
 温度： $20^\circ\text{C}$ 、回転速度：50740 r.p.m.  
 時間：46分

どのような変化が起こるかを調べる為に、全リポ蛋白  
 を密度差超遠心法によって分離した。図5は  $\rho=1.19$   
 $\text{g/ml}$  の NaBr 溶液中の浮上パターンを示したも  
 のである。浮上速度及び沈降速度分布の範囲は、既に報  
 告されている値<sup>10)</sup>とほぼ一致した。このようにして得  
 られたリポ蛋白を Oil red O と共にインキュベート  
 し、経時的に沈降パターン及び沈降速度の変化を調べ  
 た。図6はインキュベートして7日目のパターンを示  
 したもので、LDL の沈降速度には有意の差がみられ  
 るが(表1)、沈降界面の形は変化しない。従って、

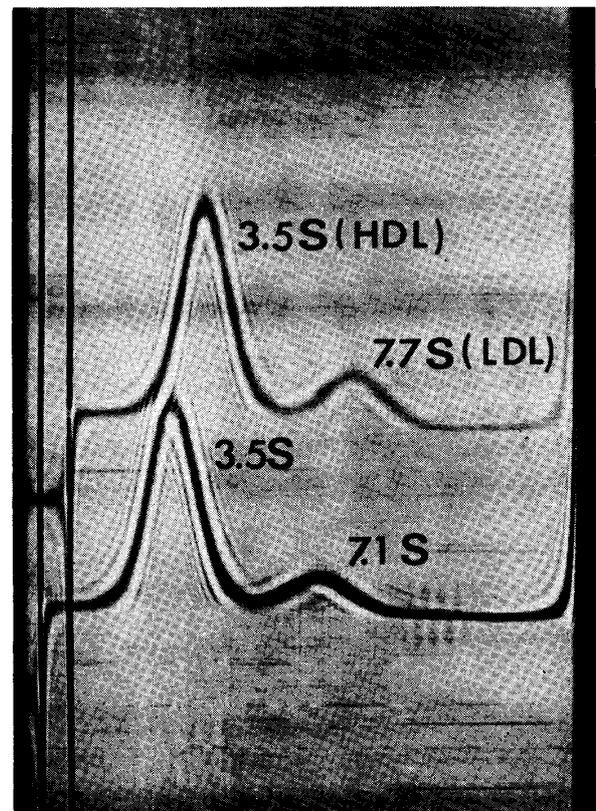


図6 Oil red O とインキュベートしたリポ蛋白  
 の沈降パターン  
 上の像：過剰の Oil red O とインキュベート  
 して7日目のリポ蛋白 (1.5%溶液)  
 下の像：Oil red O を含まないリポ蛋白 (1.5  
 %溶液)  
 溶媒は TRIS-Glycine Buffer (pH 8.3,  $\rho=$   
 $1.007\text{g/ml}$ )、遠心条件は図5と同じ。

表1 Oil red O 処理リポ蛋白の沈降定数

	未処理	1日目*	7日目*
LDL	7.1 S	7.1 S	7.7 S
HDL	3.5 S	3.5 S	3.5 S

\* 過剰の Oil red O とインキュベートして1日  
 目及び7日目のサンプル

LDL は分子の大きさに変化は起こるが、構造的に破壊されたり、分子会合などは起こらないと思われる。一方、HDL は沈降速度について有意な変化はみられなかった。

一旦リポ蛋白に取り込まれた Oil red O が、どのような速度で他のリポ蛋白に移行するかを調べる為に、予め Oil red O で飽和した HDL 又は LDL を未処理の LDL 又は HDL の同量と混和し、二つの受容体に分配される Oil red O の濃度を経時的に測定した。その結果を表2に示してある。LDL から HDL への色素の移行は、わずかに時間に依存するよ

表2 Oil red O の LDL・HDL 間の分配交換速度

	混和後経過時間	LDL (O.D. at 523nm)	HDL
L D L ↓ H D L	15分	0.342	0.146
	180分	0.308	0.137
	360分	0.329	0.151
H D L ↓ L D L	15分	0.209	0.071
	180分	0.212	0.071
	360分	0.211	0.071

上のカラムは、LDL に Oil red O を飽和させたもの (0.46%,  $S = 3 \times 10^{-5}$ g/g) に未処理の HDL (0.42%) を等量混和後、経時的にゲル電気泳動を行い、濃度分布を定量したもの。下のカラムは、HDL に Oil red O を飽和させ未処理の LDL と混和したサンプルについての濃度分布。

うであるが、それが有意であるかどうか、尚詳しい検討を要する。いずれにせよ、Oil red O の HDL-LDL 間の分配交換は極めて速やかに起こることは明らかである。

#### IV 考 察

Oil red O の血清リポ蛋白及び血清アルブミンへの取り込みは、温度と共に増加しており(図1)、いわゆる吸熱過程である。取り込みの熱力学的なパラメーターを定量的に計算することは可能であるが、Oil red O の血清の受容体 (主としてリポ蛋白) への溶解が水に対する溶解度 (20°Cで  $4 \times 10^{-4}$ g/ml) を大きく上まわっていることから ( $\Delta F^\circ < 0$ ), Oil red O の血清への溶解過程(水→血清)は、 $\Delta H^\circ > 0$ ,  $\Delta S^\circ > 0$  によって規定される過程である。おそらく、水の構造変化に基づく疎水性自由エネルギー支配の過程であ

り、Oil red O は少なくとも部分的には受容体の疎水領域に取り込まれると考えられる。

Oil red O の血清への取り込み量の時間的变化は、2つのプラトーによって特徴づけられる。このことは、一種の受容体に2つの結合サイトがあるか、もしくは少なくとも二種以上の親和性の違う受容体が存在することを示唆している。しかし、Oil red O のリポ蛋白 (VLDL+LDL+HDL) と BSA に対する溶解速度曲線の対比からわかるように(図2), Oil red O は血清アルブミンに速やかに取り込まれ、リポ蛋白へ取り込まれる量は多いが、溶解速度は遅い。従って、Oil red O の血清への溶解速度曲線の最初のプラトーは血清蛋白 (主としてアルブミン) に、次のプラトーはリポ蛋白に基づくと考えられる。このことは、ゲル濾過(図3)及び超遠心の結果(図4)とも一致する。特にゲル濾過は、血清アルブミンの取り込み速度がリポ蛋白に比較してかなり速いことを明確に示している。

Oil red O 飽和によって LDL は沈降速度定数が変化するが、HDL は全く変化を受けない。リポ蛋白の疎水領域は一種の液晶構造をとっていると考えられるが<sup>13)</sup>、おそらく、Oil red O の取り込みの深さ及び量は液晶構造の度合に依存すると考えられる。LDL の場合は、Oil red O を取り込むことによって、沈降速度定数が 7.1 S から 7.7 S に増加する。Oil red O の LDL 1 g あたりに取り込まれる量はごく微量であるから、分子量 (M) 及び比容積 ( $v$ ) に対する寄与を無視してよいであろう。この場合、Svedberg の式<sup>14)</sup> から、 $S^*/S = D^*/D$  が得られる。(ここで、 $S^*$  及び  $D^*$  は Oil red O で飽和された LDL の沈降定数及び拡散定数を示す。) この式と Einstein の式<sup>15)</sup>、 $f = RT/ND$  ( $f$ : 摩擦係数,  $R$ : 気体定数,  $N$ : アボガドロ定数) 及び Stokes の式<sup>16)</sup>、 $f = 6\pi\eta r$  ( $\eta$ : 溶媒の粘度,  $r$ : 球状高分子の半径) と組み合わせると、 $S^*/S = r/r^*$  が得られる。この式によれば、Oil red O を飽和まで取り込むことによって LDL の半径は約 0.9倍となる。Oil red O の取り込みによって、LDL の内部エントロピーが減少し、従ってそれを防ぐ為にむしろ分子の膨張が起こると予想されるのであるが、上記のデータは LDL がかなり小さくなることを示している。Oil red O の溶解は、LDL の液晶構造を大きく変化させる可能性もあり、又、蛋白質やリン脂質の部分的な脱離も考えられるので、上記のデータから一定の結論を引き出すことは不可能である。

Oil red O の LDL や HDL 分子への取り込みの

深さは、疎水性の公害物質の排泄速度との関連において、最も重要な問題である。吸収スペクトルの溶媒効果を利用する一連の予備実験を行ったが、有役な知見を得ることはできなかった。しかし、Oil red O のHLD 及び LDL 間の分配交換速度が極めて速いことから、リポ蛋白の脂肪核の中心に取り込まれているとは考えられない。

## V 要 約

疎水性低分子 (Oil red O) を血清に溶解させた場合、リポ蛋白と血清アルブミンが主な受容体として作用する。Oil red O は血清アルブミンに速やかに取り込まれるのに対し、リポ蛋白の場合は、取り込まれる量は多いが溶解速度は遅い。Oil red O の血清アルブミン及びリポ蛋白への取り込みは、いわゆる吸熱反応であり、水の構造変化に基づく疎水性自由エネルギー支配の過程である。更に、HDL は Oil red O を取り込むことにより全く変化がないが、LDL は沈降定数が7.1Sから7.7Sに増加し、Stokes 半径が約0.9倍に小さくなる。又、Oil red O のHDL 及び LDL 間の分配交換速度が極めて速いことから、Oil red O はリポ蛋白の脂肪核の中心に取り込まれているとは考えられない。

最後に、本研究にあたり御指導下さいました謝名堂昌信教授に深く感謝致します。

## 参 考 文 献

1) Davis, B.P. : J. Clin. Invest., **22**, 753 (1943)

- 2) Klotz, I.M. : The Proteins, **1**, 758 (1953)
- 3) 近藤和子 : 京都女子大学食物学科卒業論文 (昭和50年度)
- 4) Némethy, G., Scheraga, H.A. : J. Chem. Phys., **36**, 3382~3400 (1962)
- 5) Némethy, G., Scheraga, H. A. : J. Chem. Phys., **36**, 3401~3417 (1962)
- 6) Némethy, G., Scheraga, H. A. : J. Chem. Phys., **66**, 1773~1789 (1962)
- 7) Janado, M., Shimada, K., Horie, N., Nishida, T. : J. Biochem., Vol. 1. **80**, No.1. (1976)
- 8) Janado, M., Shimada, K., Nishida, T. : J. Biochem., **79**, 513 (1976)
- 9) 清水勲, 油化学, **17**, 35 (1968)
- 10) Janado, M., Martin, W.G., Cook, W.H. : Can. J. Biochem., **44**, 201 (1966)
- 11) 医学大事典, 南山堂, p. 587 (1978)
- 12) 青木幸一郎, 中埜栄三, 大井優一 : 電気泳動実験法, 廣川書店, p. 144 (1966)
- 13) 謝名堂昌信, 西田敏郎 : 蛋白質 核酸 酵素, **21**, 184~191 (1976)
- 14) Svedberg, T. : Kolloid-Z., **36**, Erg.-Bd. 53 (1925)
- 15) Einstein, A. : Ann. Physik., **17**, 549 (1905)
- 16) Stokes, G.G. : Trans. Cambridge. Phil. Soc., **9**, Part II, 8 (1856)